

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 09 MAR 2005



WIPO

PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 29415P WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/13964	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 09.12.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09.12.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/67		
Anmelder F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt 4 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - I ☒ Grundlage des Bescheids
 - II ☐ Priorität
 - III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 08.07.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 08.03.2005
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Meyer, W Tel. +49 89 2399-8157 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-31 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-23 eingegangen am 24.11.2004 mit Schreiben vom 24.11.2004

Zeichnungen, Blätter

1/16-16/16 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/13964

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Feststellung | |
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-23
Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (IS) | Ja: Ansprüche 1-23
Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche 1-23
Nein: Ansprüche |

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Der veränderte Anspruchssatz, der mit dem Schreiben vom 24.11.2004 eingereicht wurde, ist gemäß Artikel 19(2) und 34(2) PCT zulässig.
2. Es wird auf das/die folgende/folgenden Dokument/e verwiesen:
D1: STENSTROM C MAGNUS ET AL: "Cooperative effects by the initiation codon and its flanking regions on translation initiation" GENE (AMSTERDAM), Bd. 273, Nr. 2, 8. August 2001 (2001-08-08), Seiten 259-265, XP002285920 ISSN: 0378-1119
3. Das Dokument D1 wird als nächstliegender Stand der Technik gegenüber dem Gegenstand des Anspruchs 1-24 angesehen. Es offenbart die Purin reiche Shine-Dalgarno (SD) Sequenz, welche einige Basen Stromaufwärts von der mRNA Initiations Site liegt unterstützt Translation Initiation. Die Codon Sequenz flussabwärts der Flussabwärts Region (DR), beinhaltet, den +2 Codon, der unmittelbar dem Initiations Codons folgt, ist auch sehr wichtig für Initiation Effizienz. Hierbei wird die Interaktion dieser drei Initiations Determination für die Genexpression in E. coli untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden daß stark Expression E. coli Gene bei dem Startcodon folgenden +2 Codon einen hohen Gehalt an Adenin aufweisen.

Der Gegenstand des Anspruchs 1-24 ist somit neu (Artikel 33(2) PCT):

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, daß ein Verfahren zur optimierten Herstellung von Proteinen bereitgestellt wird.

Die in Ansprüchen 1-24 der vorliegenden Anmeldung für diese Aufgabe vorgeschlagene Lösung beruht aus den folgenden Gründen auf einer erfinderischen Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT):

Der Fachmann kann nicht unmittelbar erkennen, daß die Bereitstellung einer für das Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, wobei 3'-seitig des

Translationsstartcodons eine heterologe Nukleinsäuresequenz im korrekten Leserasster eingefügt wird, die so gewählt wird, daß in einem Abstand von 6-30 Nukleotiden 3'-seitig des Translation-Startcodons eine Stem-Loop-Struktur ausgebildet wird, das dies zu einer Optimierung der Protein Synthese führt.

PCT/EP03/13964

29415P-WO/WWPBpu

Neue Ansprüche 1 bis 23

1. Verfahren zur Herstellung eines Proteins, umfassend die Schritte:
 - (a) Bereitstellen einer für das Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, wobei 3'-seitig des Translations-Startcodons eine heterologe Nukleinsäuresequenz im korrekten Leseraster eingefügt wird, die so gewählt wird, dass in einem Abstand von 6-30 Nukleotiden 3'-seitig des Translations-Startcodons eine Stem-Loop-Struktur ausgebildet wird,
 - (b) Bereitstellen eines zur Expression des Proteins geeigneten Expressionssystems und
 - (c) Einbringen der Nukleinsäuresequenz gemäß (a) in das Expressionssystem gemäß (b) unter Bedingungen, dass eine Stem-Loop-Struktur ausgebildet wird, worin die Länge des Stem im Bereich von 4-12 Nukleotiden ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, weiterhin umfassend das Gewinnen des Proteins.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass die eingefügte heterologe Nukleinsäuresequenz eine Länge bis zu 201 Nukleotiden aufweist.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass die eingefügte heterologe Nukleinsäuresequenz eine Länge bis zu 45 Nukleotiden aufweist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Stem-Loop-Struktur in einem Abstand von 12-21 Nukleotiden 3'-seitig des Startcodons ausgebildet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Bereich der heterologen Nukleinsäuresequenz, der 5'-seitig der Stem-Loop-Struktur liegt, selbst keine Sekundärstruktur ausbildet und keine Sekundärstruktur mit der 5'-untranslatierten Region der für das herzustellende Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz eingehen kann.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Bereich der heterologen Nukleinsäuresequenz, der 5'-seitig der Stem-Loop-Struktur und 3'-seitig des ATG-Startcodons liegt, einen GC-Gehalt von <50 % aufweist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass man ein *in vitro* Expressionssystem verwendet.
9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man ein prokaryontisches *in vitro* Expressionssystem verwendet.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass das prokaryontische *in vitro* Expressionssystem Lysate von gram-negativen Bakterien, insbesondere von *Escherichia coli*, oder gram-positiven Bakterien, insbesondere *Bacillus subtilis*, enthalten.
11. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man ein eukaryontisches *in vitro* Expressionssystem verwendet.
12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
dass das eukaryontische *in vitro* Expressionssystem Lysate von Säugerzellen,

insbesondere von Kaninchen, Reticulocyten, humanen Tumorzelllinien, Hamsterzelllinien, oder anderen Wirbeltierzellen, insbesondere Oozyten und Eiern von Fischen und Amphibien, sowie Insektenzelllinien, Hefezellen, Algenzellen oder Extrakte aus Pflanzenkeimen enthält.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7
dadurch gekennzeichnet,
dass man ein prokaryontisches *in vivo* Expressionssystem verwendet.
14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine prokaryontische Wirtszelle als Expressionssystem verwendet.
15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle, insbesondere eine *E.coli* Zelle, oder eine gram-positive prokaryontische Wirtszelle, insbesondere eine *Bacillus subtilis* Zelle, verwendet.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine eukaryontische Wirtszelle als Expressionssystem verwendet.
17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine Hefezelle, eine Insektenzelle oder eine Wirbeltierzelle, insbesondere eine Amphibien-, Fische-, Vogel- oder Säugerzelle, verwendet.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass man einen nicht-humanen eukaryontischen Wirtsorganismus als Expressionssystem verwendet.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Bereitstellen der für das Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz durch Klonierung, Rekombination oder/und Amplifikation erfolgt.
20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Bereitstellen eine Zweistufen-PCR umfasst.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
dass die für das herzustellende Protein kodierende Nukleinsäuresequenz oder/und die heterologe Nukleinsäuresequenz zumindest teilweise eine an das jeweiligen Expressionssystem angepasste Codon-Nutzung aufweisen.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
dass die heterologe Nukleinsäuresequenz einen für eine Aufreinigungsdomäne oder/und einen für eine Proteinase-Erkennungsdomäne kodierenden Abschnitt enthält.
23. Reagenz zur Herstellung eines Proteins, umfassend
- (a) eine zu der für das Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz heterologe Nukleinsäuresequenz, die im korrekten Leseraster in die Protein-kodierende Nukleinsäuresequenz eingefügt werden kann, und die in einem Abstand von 6-30 Nukleotiden 3'-seitig des Translations-Startcodons eine Stem-Loop-Struktur ausbilden kann, und
 - (b) ein zur Herstellung des Proteins geeignetes Expressionssystem.